

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 05155877
PUBLICATION DATE : 22-06-93

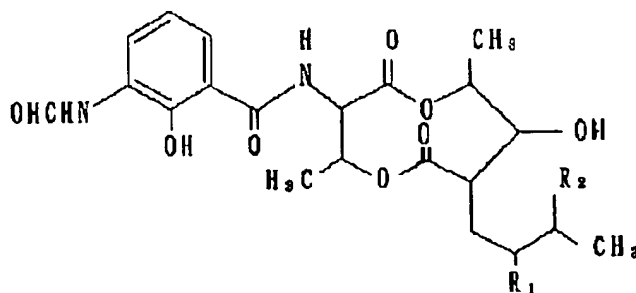
APPLICATION DATE : 15-08-91
APPLICATION NUMBER : 03205319

APPLICANT : KAIYO BIO TECHNOL
KENKYUSHO:KK;

INVENTOR : SANO HIROSHI;

INT.CL. : C07D313/00 C12P 17/08 //(C12P 17/08
, C12R 1:465)

TITLE : NOVEL SUBSTANCES:
URAUCHIMYCIN A AND
URAUCHIMYCIN B AND PRODUCTION
THEREOF



ABSTRACT PURPOSE: To provide novel substances urauchimycins A or B having antifungal activities.

CONSTITUTION: The compound of the formula (when R₁ is methyl and R₂ is H, the formula means urauchimycin A, while in the case R₁ is H and R₂ is methyl, it means urauchimycin B). The physical and chemical properties of Urauchimycin A are, molecular weight: 450; molecular formula: C₂₂H₃₀N₂O₈ [mass analysis: FAB-MAS 450 (M+1)⁺]; specific rotation: [α]_D²⁶=+46.7 (c=0.03 in methanol); solubility: soluble in chloroform, ethanol, ethyl acetate, acetone, slightly soluble in water and n-hexane; color reactions: positive to sulfuric acid; color of the substance: colorless. The compound of the formula is prepared by culturing a microorganism producing urauchimycin A and B belonging to Streptomyces [Streptomyces sp. FERM-P-12392]. to accumulate the substances in the culture and then collecting these antibiotics.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-155877

(43) 公開日 平成5年(1993)6月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 313/00		6701-4C		
C 1 2 P 17/08		2104-4B		
// (C 1 2 P 17/08				
C 1 2 R 1:465)				

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平3-205319

(22) 出願日 平成3年(1991)8月15日

(71) 出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
東京都文京区本郷二丁目35番10号

(72) 発明者 今村 信孝

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内

(72) 発明者 足立 恭子

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内

(72) 発明者 西島 美由紀

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

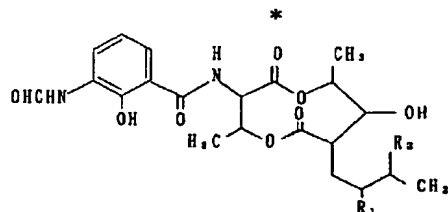
(54) 【発明の名称】 新規物質ウラウチマイシンA、ウラウチマイシンBおよびそれらの製造法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、新規物質ウラウチマイシンA、ウラウチマイシンBおよびそれらの製造法を提供することを目的とする。

* 【構成】 本発明は、下記の一般式で示される新規物質ウラウチマイシンAおよびB、

【化1】



ならびにストレプトマイセス属に属し、該新規物質生産能を有する微生物を利用して該新規物質を製造する方法に関する。

【効果】 本発明により抗真菌活性を有する新規物質ウラウチマイシンAおよびBが提供される。

(2)

特開平5-155877

1

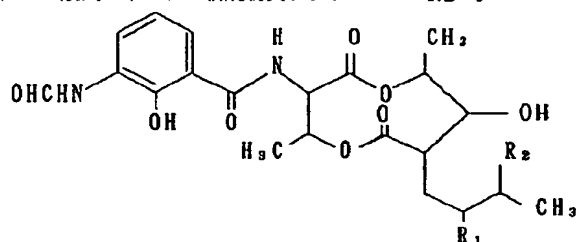
2

【特許請求の範囲】

*チマイシンAまたはB。

【請求項1】 下記的一般式で示される新規物質ウラウ*

【化1】



(式中、 R_1 が CH_3 及び R_2 がHの場合は、ウラウチマイシンAであり、 R_1 がH及び R_2 が CH_3 の場合はウラウチマイシンBである)

【請求項2】 ストレプトマイセス属に属しウラウチマイシンAおよびBを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中にウラウチマイシンAおよびBを生産蓄積させ、該生産蓄積したウラウチマイシンAまたはBを採取することを特徴とするウラウチマイシンAまたはBの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ウラウチマイシンAまたはB（以下両化合物を含めてウラウチマイシンと記す）およびそれらの製造法に関する。ウラウチマイシンは真菌の形態変化阻害による抗真菌作用を有し、抗真菌剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】従来、抗真菌抗生物質としてポリエンマクロライド系化合物、ポリエーテルマクロライド系化合物、アンチマイシン系化合物などの化合物が報告されて

※男・中村昭四郎著 東京大学出版会、1982年、53、127-131、182-188】。

【0003】ウラウチマイシンはその構造式から新規な物質であることが明らかになった。

【0004】

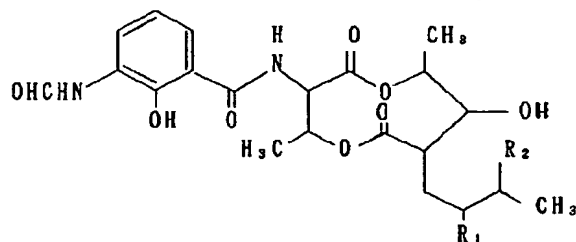
【発明が解決しようとする課題】抗真菌剤として現在臨床に用いられているものは、ポリエンマクロライド系抗生物質アンフォテリシンB、或は5-フルオロウラシルなどの合成剤であるが、毒性などの問題もあり、より優れた抗真菌剤が求められている。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、ストレプトマイセス属に属する菌株の培養により得られる化合物が形態変化阻害による抗真菌作用を有することならびに該化合物が新規化合物であることを見だし、本発明を完成した。本発明は一般式

【0006】

【化2】



(式中、 R_1 が CH_3 及び R_2 がHの場合は、ウラウチマイシンAであり、 R_1 がH及び R_2 が CH_3 の場合はウラウチマイシンBである)

【0007】で表される抗真菌作用を有する新規化合物ウラウチマイシン、およびストレプトマイセス属に属し、該新規物質生産能を有する微生物を利用して該新規物質を製造する方法に関する。以下に本発明を詳細に説明する。以下にウラウチマイシンAの理化学的性質を示す。

★(1) 分子量：450

(2) 分子式： $C_{22}H_{30}N_2O_8$ 質量分析：FABMS; 451 (M+1)⁺

【0008】

【外1】

★(3) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} +46.7^\circ$ (c 0.03, メタノール)

【0009】(4) 紫外線吸収スペクトル (エタノール 50 中) : 343, 225 nm

(5) 赤外線吸収スペクトル (KBr)

1746, 1684, 1644, 1539, 1435, 1369, 1261, 1197, 1060, 746 cm^{-1}

(6) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 中で測定, 500MHz)

δ (ppm): 0.86(d, 3H), 0.89(d, 3H), 1.27(m, 2H), 1.31(d, 3H), 1.32(m, 1H), 1.46(d, 3H), 1.51(m, 1H), 1.84(ddd, 1H), 1.91(br. d, 1H), 2.49(ddd, 1H), 3.59(br. dt, 1H), 4.88(dq, 1H), 5.25(t, 1H), 5.70(dq, 1H), 6.92(t, 1H), 7.09(br. d, 1H), 7.24(br. d, 1H), 7.89(br. s, 1H), 8.49(d, 1H), 8.55(d, 1H), 12.40(br. s, 1H)

(7) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 中で測定, 125MHz)

δ (ppm): 11.3(q), 15.0(q), 18.4(q), 18.5(q), 30.5(t), 32.4(d), 35.8(t), 50.0(d), 53.8(d), 70.7(d), 76.3(d), 77.1(d), 112.6(s), 119.0(d), 120.1(d), 124.8(d), 127.4(s), 150.6(s), 158.9(d), 169.4(s), 170.1(s), 173.8(s)

(8) 溶解性: クロロホルム, エタノール, 酢酸エチル*

(3) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 50.0^\circ$ (c 0.1, メタノール)

[0011] (4) 紫外線吸収スペクトル (エタノール 中): 343, 225 nm

(5) 赤外線吸収スペクトル (KBr)

1746, 1684, 1644, 1539, 1435, 1369, 1261, 1197, 1060, 746 cm^{-1}

(6) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 中で測定, 500MHz)

δ (ppm): 0.89(dd, 6H), 1.15(m, 2H), 1.31(d, 3H), 1.46(d, 3H), 1.54(m, 1H), 1.68(m, 1H), 1.78(m, 1H), 1.93(br. d, 1H), 2.32(ddd, 1H), 3.60(br. dt, 1H), 4.87(dq, 1H), 5.32(t, 1H), 5.69(dq, 1H), 6.92(t, 1H), 7.07(br. d, 1H), 7.26(br. d, 1H), 7.88(br. s, 1H), 8.49(d, 1H), 8.55(d, 1H), 12.40(br. s, 1H)

(7) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 中で測定, 125MHz)

δ (ppm): 15.0(q), 18.4(q), 22.2(q), 22.6(q), 26.8(t), 28.0(d), 36.2(t), 52.3(d), 53.7(d), 70.8(d), 76.3(d), 77.1(d), 112.6(s), 119.0(d), 120.1(d), 124.8(d), 127.4(s), 150.6(s), 158.9(d), 169.4(s), 170.1(s), 173.9(s)

(8) 溶解性: クロロホルム, エタノール, 酢酸エチルおよびアセトンに可溶, 水およびn-ヘキサンには難溶。

(9) 呈色反応: 硫酸発色陽性

(10) 物質の色: 無色物質

(11) 薄層クロマトグラフィー: シリカゲル薄層 (Kiesel gel 60 F₂₅₄ Art. 5554 Merck社製), ベンゼン: アセトン (3:1 v/v) の展開溶媒でのRf値は0.45

(12) 高速液体クロマトグラフィー: カプセルバック C18 AG120 (4.6mm ϕ \times 25cm, 資生堂社製), アセトニトリル: 水: 酢酸 (50:50:0.01 v/v, 流速 1ml/分) での保持時間は21.9分

次にウラウチマイシンBの生物活性について説明する。

*よびアセトンに可溶, 水およびn-ヘキサンには難溶。

(9) 呈色反応: 硫酸発色陽性

(10) 物質の色: 無色物質

(11) 薄層クロマトグラフィー: シリカゲル薄層 (Kiesel gel 60 F₂₅₄ Art. 5554 Merck社製), ベンゼン: アセトン (3:1 v/v) の展開溶媒でのRf値は0.45

(12) 高速液体クロマトグラフィー: カプセルバック C18 AG120 (4.6mm ϕ \times 25cm, 資生堂社製), アセトニトリル: 水: 酢酸 (50:50:0.01 v/v, 流速 1ml/分) での保持時間は23.8分

次にウラウチマイシンBの理化学的性質を示す。

(1) 分子量: 450

(2) 分子式: $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8$

質量分析: FAB/MS; 451(M+1)⁺

高分解能FAB/MS: 451.2068(M+1)⁺

$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8$ としての計算値; 451.2080

[0010]

[外2]

(c 0.1, メタノール)

[0012] ウラウチマイシンAおよびBは寒天培地上のカンジダ・アルビカンズ IF01060の仮性菌糸および菌糸の形成を10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で阻害し、抗真菌剤となる。なお、グラム陽性細菌 (バチルス・ズブチルス IF013719) およびグラム陰性細菌 (エシェリキア・コリ IF03301) の生育には100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で影響は観察されない。

[0013] 次にウラウチマイシンの製造法について説明する。ウラウチマイシンはストレプトマイセス属に属し、ウラウチマイシンを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中にウラウチマイシンを生成蓄積させ、該培養物からウラウチマイシンを採取することによって得ることができる。

[0014] ウラウチマイシン生産菌としてはストレプトマイセス属に属し、ウラウチマイシン生産能を有する菌株であればいずれの菌株でも用いることができる。またこれらの菌株の人工的変異方法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理などあるいは自然発生による変異株でもウラウチマイシンを生産するものであれば本発明に用いることができる。代表的菌株としてNi-80株があげられる。

[0015] Ni-80株の菌学的性質について以下に述べるが、該性質の決定は、国際ストレプトマイセス (Streptomyces) プロジェクト (ISP) がストレプトマイセス種の特性決定のために推奨する方法 [E. B. シェリング (E. B. Shirling) およびD. ゴットリーブ (D. Gottlieb), インターナショナル・ジャーナル・システムティック・バクテリオロジー (Int. J. Syst. Bacteriol.) 16, 313~340 (1969)] に従った。全細胞の加水分解物中のジアミノピメリン酸の異性体はビー・ベッカー (B. Becker) らの方法 [アブライド・ミクロバイオロジー (App

1. Microbiol.)12巻:421~423 (1964)] によって確認した。形態学的検討は、光学顕微鏡を用い、特に胞子表面の形態については走査型電子顕微鏡によった。色の表現番号は標準色票〔(財)日本規格協会:JIS Z8721準拠〕を使用した。Ni-80株の菌学的性質は次の通りである。

【0016】(1) 形態

気菌系:分岐する。

基生菌系:分岐するが、分断はない。

胞子:気菌系上に分節胞子(10個から30個もしくはさらに多数)の長い連鎖として着生する。連鎖の形態は屈曲状。

【0017】胞子の表面:平滑(Smooth)

胞子の運動性:なし

胞子の形・大きさ:楕円形(0.5×0.7 μm)

なお、菌核、胞子のうは観察されない。

(2) 色調

気菌系:白褐色~灰白色

基生菌系:淡黄色~淡褐色

可溶性色素:淡褐色

メラニン色素:なし

(3) 細胞壁の化学組成

ジアミノピメリン酸の立体型:LL型

(4) 生理的性質

炭素源の同化性:

同化する:グルコース、キシロース、マンニトール、アラビノース、フラクトース

やや同化する:シュークロース、イノシトール、ラムノース

同化しない:ラフィノース

ゼラチンの液化:陽性

スターチの加水分解:陽性

脱脂牛乳の凝固:陽性

脱脂牛乳のペプトン化:陽性

生育温度範囲:10~37℃(至適28~32℃)

なお、至適生育温度範囲については2日後、ゼラチンについては28℃、1カ月、脱脂牛乳については、28℃、1週間後の結果を、そのほかの性質は28℃2週間後の結果を示した。

【0018】(5) 各種寒天培地における生育状態

各種寒天培地で28℃、21日間、Ni-80株を培養した結果を表1に示す。なお、略号は次の通り、G:生育の程度、AM:気菌系の着生度および色調、SM:基生菌系の色調、P:可溶性色素の色調。Ni-80株は、エム・ピー・レcheバリエとエイチ・エー・レcheバリエ(M.P. Lechevalier and H. A. Lechevalier)による放線菌の分類

20 [インターナショナル・ジャーナル・システムティック・バクテリオロジー(Int. J. Syst. Bacteriol.)20巻、435~443 (1970)] によるとLL型のジアミノピメリン酸が検出されることから、細胞壁I型となる。さらに該菌株の形態学的特徴を組み合わせると、この菌株を、ストレプトマイセス属に帰属させるのが適当である。

【0019】

【表1】

培 地 名	生 育 状 態
シュクロース・硝酸塩寒天培地	G : 貧弱 AM : 少ない淡白黄色 (5YV9C2) SM : 乳白色 (5YV9C3) P : なし
グルコース・アスパラギン寒天培地	G : やや貧弱 AM : 少ない薄茶色 (2.5YV9C2) SM : オリーブ色 (5YV6C8) P : 淡褐色
グリセリン・アスパラギン寒天培地	G : 良好 AM : 豊富ベージュ (2.5YV9C2) SM : 淡褐色 (2.5YV7C4) P : 薄い黄褐色
スターチ寒天培地	G : 良好 AM : 豊富淡白黄色 (2.5YV9C2) SM : 緑茶褐色 (5YV4C6) P : 極薄い褐色
チロシン寒天培地	G : 良好 AM : 豊富 薄茶色 (2.5YV8C2) SM : 淡褐色 (2.5YV7C4) P : 淡褐色
栄養寒天培地	G : 普通 AM : 中程度淡白黄色 (2.5YV9C) SM : 淡黄褐色 (5YV8C4) P : なし
イースト・麦芽寒天培地	G : 普通 AM : 中程度灰白色 (10YR8C1) SM : 黄褐色 (2.5YV7C6) P : ライトブラウン
オートミール寒天培地	G : 良好 AM : 豊富 白褐色 (5YV8C2) ~ 灰白色 (5YV7C1) SM : オリーブ色 (5YV6C6) P : 淡褐色
ペプトン・酵母エキス・鉄寒天培地	G : 普通 AM : 中程度 白色 (2.5YV9N) ~ 薄茶色 (2.5YV8C2) SM : 乳白色 (2.5YV9C3) P : 淡褐色

【0020】本属における種の同定においては、細菌学名承認リスト [ヴィー・ビー・ディー・スカーマン (V. B. D. Skerman) ら、Int. J. Syst. Bacteriol. 30巻、225~420 (1980)] で承認されている種名より、該菌株と分類的特徴が類似している種をISPの記載 [Int. J. Syst. Bacteriol. 18巻、69~189、(1968)、同誌、18巻、279~392、(1968)、同誌、19巻、391~512、(1969)、同誌、22巻、265~394、(1972) およびアール・イー・ブカナン (R. E. Buchanan) とエヌ・イー・ギボンズ (N. E. Gibbons) 編、パーシーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Berge's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版]

をもとに検索した。

40 【0021】検索の結果、Ni-80株の性質と一致する種を特定することは困難であり、Ni-80株をストレプトマイセス・sp. (Streptomyces sp.) として工業技術院微生物工業技術研究所に微工研寄第12392号 (FERM P-12392) として寄託した。(原寄託日：平成3年7月30日) 次に培養法について述べる。

【0022】本発明の培養においては通常の放線菌の培養方法が一般に用いられる。培地としては資化可能な炭素源、窒素源、無機物および必要な生育、生産促進物質を程よく含有する培地であれば合成培地、天然培地いず

50

粉、デキストリン、マンノース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などを単独または組み合わせて用いられる。さらに、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独または組み合わせて用いられる。そのほか、必要に応じて食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、燐酸二水素カリウム、燐酸水素ナトリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガ、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類を加える。さらに使用菌の生育やウラウチマイシンの生産を促進する微量成分を適当に添加することができる。

【0023】培養法としては、液体培養法が最も適している。培養温度は16～32℃が適当であり、培養中の培地のpHは炭酸カルシウムなどの添加により、4～10、特に6～8に維持することが望ましい。液体培養で通常1～7日培養を行なうと、目的物質ウラウチマイシンが培養液中および菌体中に生成蓄積される。

【0024】培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止する。培養物からウラウチマイシンの単離精製は、微生物代謝生産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行なわれる。例えば培養物を濾過により培養濾液と菌体に分け、菌体をクロロホルム、アセトンなどで抽出する。ついで、抽出液と培養濾液とを合わせて、酢酸エチルなどで抽出する。抽出液を濃縮し、シリカゲルによるカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどにより、ウラウチマイ

シンの無色粉末を得る。

【0025】なお、培養、精製操作中のウラウチマイシンの動向は薄層クロマトグラフィーによるウラウチマイシンの紫外線吸収を目安として追跡することができる。以下に本発明の実施例を示す。

【0026】

【実施例】種菌としてストレプトマイセス・sp. Ni-80を用いた。該菌株を500ml容量の三角フラスコ中のブイヨン（ニッスイ社製）20g/l、グルコース 10g/l、炭酸カルシウム 4g/l の組成を有する50%海水培地（海水：蒸留水＝1：1、殺菌前pH7.4）150mlに植菌し、30℃で168時間攪拌（110rpm）培養した。

【0027】このようにして得られた培養液2リットルを濾過し、得られた濾液を酢酸エチルで抽出、減圧乾固することにより、抽出物 107mgを得た。これを中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー（Merck 社製Kieselgel 160、230-400mesh）により分画し、活性画分4mgを得た。この粗精製物を逆相HPLCカラム（資生堂製 capsell pack C18 AG120、10mmφ×250mm：溶出溶媒アセトリル：水：酢酸＝55：45：0.01）で精製し、ウラウチマイシンA 0.3mg、およびウラウチマイシンB1.0mgを得た。

【0028】ここで得たウラウチマイシンAおよびBは、前記した理化学的性質および生物学的性質を示した。

【0029】

【発明の効果】本発明により抗真菌活性を有する新規発酵生産物ウラウチマイシンAまたはB、及びその製造法が提供される。

フロントページの続き

(72)発明者 佐野 浩

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内